



República Federativa do Brasil
Ministério da Economia
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(21) BR 102021007385-3 A2



(22) Data do Depósito: 17/04/2021

(43) Data da Publicação Nacional: 25/10/2022

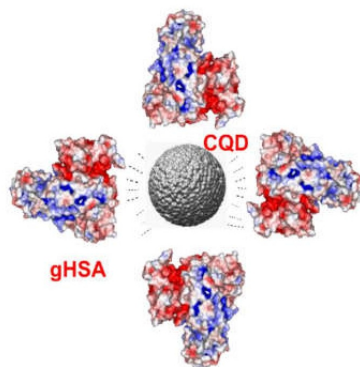
(54) **Título:** NANOPROBES CARBONÁCEOS DE BAIXO CUSTO E TOXICIDADE PARA O CONTROLE GLICÊMICO VIA DETECÇÃO SELETIVA IN VITRO/IN VIVO DA ALBUMINA GLICADA

(51) **Int. Cl.:** G01N 33/68; G01N 33/533; C07K 14/765; B82Y 5/00.

(71) **Depositante(es):** UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO.

(72) **Inventor(es):** JORGE LUIZ NEVES; ELIZABETH CRISTINA MARTINS DA SILVA; THAIS MEIRA MENEZES; LARISSA MIRELLA MENDES SILVA; MARCELA JACINTA RODRIGUES.

(57) **Resumo:** NANOPROBES CARBONÁCEOS DE BAIXO CUSTO E TOXICIDADE PARA O CONTROLE GLICÊMICO VIA DETECÇÃO SELETIVA IN VITRO/IN VIVO DA ALBUMINA GLICADA. A presente invenção baseia-se no desenvolvimento e aplicação de nanopartículas carbonáceas para detecção de proteínas glicadas, visando o controle de diabetes. O êxito na obtenção desses sistemas, foram confirmados por diversas técnicas físico-químicas. As nanopartículas são bem distribuídas em tamanho (5 nm) e formato esférico. Estas nanopartículas são quimicamente inertes, baixo custo, fácil funcionalização, alta biocompatibilidade, baixa toxicidade e com luminescência multicolorida. Além disso, exibem alta foto-estabilidade, resistência a fotodegradação e alta solubilidade em meios aquosos e solventes orgânicos, superior a outras nanopartículas fluorescentes. Estas nanopartículas servem como excelentes sondas nanométricas, capazes preferencialmente de se ligar a albumina glicada (índice glicêmico de médio prazo) e detectar o complexo nanopartícula-albumina glicada através das propriedades luminescentes das nanopartículas. Além disso, podem ser usadas em diversas amostras complexas como sangue e urina, sofrendo de baixa interferência de componentes moleculares presentes neste tipo de amostra. Finalmente, podem ser aplicadas em meios biológicos (in vivo), para imageamento e dosagens glicêmicas em órgãos específicos, visando diagnósticos e tratamentos mais precisos em doenças como diabetes.



Nanoprobos carbonáceos de baixo custo e toxicidade para o controle glicêmico via detecção seletiva *in vitro/in vivo* da albumina glicada

Campo da invenção

[001] A presente patente de invenção concentra-se em nanopartículas de carbono para aplicação biotecnológica como biosensor de proteínas glicadas (biomarcador de médio prazo), visando o controle glicêmico e posteriormente o diagnóstico de doenças como diabetes.

Fundamentos da invenção

[002] Atualmente, através do avanço tecnológico tem-se disponível sistemas e dispositivos precisos à detecção de proteínas glicadas para o controle de diabetes, utilizando diferentes biomarcadores altamente sensíveis ao controle glicêmico. Um dos principais objetivos é a aplicação de métodos que possuam a utilidade de rastreio de proteínas glicadas, possibilitando o diagnóstico de pré-diabetes, atuando como uma alternativa de intervenção para o avanço da doença.

[003] A dosagem de proteínas glicadas atua com alta eficácia em medições e monitoramento do controle glicêmico de curto e longo prazo. Além disso, elas fornecem medições sensíveis, precisas e menos suscetíveis à ação de interferentes. Tradicionalmente utilizada, a Hemoglobina glicada é aplicada em medições de longo prazo (120 dias). Já para medições de médio prazo e maior eficácia do controle glicêmico, tem-se como alternativa promissora as medições de albumina glicada, uma frutossamina de meia vida circulante de cerca de 20 dias, que possui alta relevância e aplicabilidade em contextos em que hemoglobina glicada não é recomendada, e até mesmo no monitoramento glicêmico casual de médio prazo.

[004] A partir destes parâmetros, a albumina glicada atua como eficaz ferramenta em casos em que hemoglobina glicada apresenta baixa confiabilidade, como em casos de hemoglobinopatias, hemólises e anemias (KIM; LEE, 2012). Além disso, a determinação de albumina glicada também é útil

no controle glicêmico de grávidas ou em pacientes que posteriormente serão envolvidos em procedimentos cirúrgicos, onde há a necessidade de resultados e intervenções de curto prazo. Também pode atuar diretamente como uma forma de melhorar a qualidade de vida do portador de diabetes mellitus, tendo em vista que a partir de suas medições de médio prazo (cerca de 20 dias) é possível a intervenção médica na dieta e tratamento do paciente.

[005] Derivada de uma reação não enzimática, a albumina glicada constitui cerca de 80% do total de proteínas glicadas, levando alguns estudiosos a definirem a determinação de frutossamina como a determinação de Albumina glicada (FUJIMOTO, C. Y. et al, 2016). A determinação da frutossamina representa significativo progresso para o controle glicêmico, já que pode ser determinada de forma eficaz em processos rápidos e completamente automatizados.

[006] Albumina glicada é um processo decorrente da glicação de proteínas, envolvendo a adição não enzimática de açúcares redutores como a glicose. Em seu estágio inicial ocorre o ataque nucleofílico com grupos amina primária de proteínas na glicose, formando uma base Schiff. A albumina glicada caracteriza-se como um potencial biomarcador de controle glicêmico, superando a hemoglobina glicada, tendo em vista que reflete os níveis de glicose no sangue das 3 últimas semanas, atuando também como um método de rastreamento para o diabetes. Além disso, a albumina glicada não sofre interferências decorrentes do tempo de sobrevivência das hemácias ou da concentração de outras proteínas no plasma. Os métodos de determinação do respectivo biomarcador, incluem a cromatografia por afinidade, cromatografia líquida de alta eficiência e métodos calorimétricos. Entretanto, pouco utilizadas devido ao custo elevado, evidenciando a necessidade de ampliação de métodos mais simples e de baixo custo.

[007] Uma classe de nanomateriais que tem se destacado para aplicações biotecnológicas e medicinais, são nanopartículas de carbono ou “Carbon Quantum Dots (CQD)” um tipo de nanomaterial com propriedades que incluem biocompatibilidade, baixa toxicidade, biofuncionalidade, fotoluminescência e

solubilidade aquosa, destacando-se como um potencial biosensor (KUANG et al., 2011, SALATA, 2004).

[008] Através de pesquisas relacionadas a área de diagnóstico e controle de diabetes, constata-se a existência de diversos estudos referentes ao controle glicêmico. Grande parte dos métodos recentes destinados à finalidade de rastreamento e monitoramento glicêmico, representam melhorias significativas em comparação com exames tradicionais amplamente aplicados. Estudos semelhantes à presente patente de invenção, que utilizam diferentes mecanismos de execução, reforçam a exequibilidade e aplicação de novas técnicas destinadas ao controle de diabetes mellitus. As seguintes invenções podem atuar como ferramentas alternativas ao controle de diabetes, embora utilizem mecanismos de ação diferentes:

[009] A patente EP1664783B1 intitulada “Rapid test for glycated albumin” trata-se de um sistema imunocromatográfico de medições dos níveis de albumina glicada em amostras de sangue de pacientes com diabetes e registra esses dados, possibilitando controle glicêmico eficaz devido histórico de medições armazenadas. O estudo citado nessa sessão, não possui relação com a presente invenção, pois o método descrito na presente invenção pode atuar como um mecanismo duplo, sendo aplicado para o rastreamento da diabetes, visando a reversão do quadro glicêmico em pacientes com pré-diabetes e como controle glicêmico para o indivíduo que já possui diabetes, não sendo limitado apenas a um teste de controle glicêmico do paciente que já é portador da enfermidade.

[010] A patente USRE46118E1 intitulada “Method of selectively determining glycated hemoglobin” trata-se de um método de determinação de uma quantidade de hemoglobina glicada. Essa proporção pode ser aferida pela degradação da hemoglobina glicada em uma amostra de sangue, resultando em uma determinação precisa e de ampla facilidade. A presente patente diferencia-se da patente citada, já que utiliza a albumina glicada como agente principal à detecção de diabetes, sendo de promissora utilidade e aplicação, pois sofre de baixa interferência de outros componentes presentes na corrente

sanguínea (WU et al.,2016)

[011] A patente US5110745A intitulada “Methods of detecting glycated proteins” utiliza fluidos corporais com alta probabilidade de conter esse tipo de proteína, submetendo essa amostra em uma composição aglutinante. A amostra teste é exposta ao composto glicado fixado à um suporte sólido sob condições que permitem a reação da composição de ligante não ligado da etapa anterior, a pelo menos uma porção do composto glicado no suporte sólido. Em seguida composto glicado afixado a um suporte sólido da etapa que não foi reagido com a composição de ligante não ligado, é reagido com um agente de detecção. Posteriormente, o agente de detecção é detectado. A presença desse agente detector indica a presença da proteína glicada na amostra de teste. A patente citada não se assemelha ao presente estudo, tendo em vista que se utilizou no presente estudo, carbon dots altamente sensíveis como agente detector de proteínas glicadas, atuando de maneira direta no rastreamento da albumina glicada, e que através dos estudos interacionais observou-se fortes interações entre esses dois componentes, mesmo na presença de potenciais componentes interferentes.

[012] A patente US20020164811A1 intitulada “Novel method for measurement of glycated hemoglobin by a rapid strip test procedure” detalha-se como um dispositivo que utiliza a hemoglobina glicada (HbA1c) como agente principal do controle glicêmico, visando obter a complexação química da hemoglobina glicada. A patente citada difere-se do estudo em abordagem, tendo em vista que o uso da hemoglobina glicada para a finalidade de diagnóstico e controle glicêmico é suscetível a interferências, resultando em medições menos precisas e que são advindas principalmente do tempo de sobrevivência das hemácias. Sendo necessário um componente principal de detecção de menor sensibilidade às interferências e maior sensibilidade ao rastreamento de proteínas glicadas.

[013] A patente US20060270060A1 intitulada “Rapid test for glycated albumin in saliva” é um teste imunocromatográfico rápido que mede a proporção de albumina glicada na saliva em relação à albumina total.

Essa proporção fornece uma indicação da quantidade média de glicação de proteínas que ocorreu no período de 2 a 3 semanas. A patente citada difere-se da pesquisa em abordagem, devido os mecanismos de detecção da albumina glicada. No presente estudo não foram utilizadas proporções como agente de detecção. Foram utilizadas nanopartículas biocompatíveis, de baixo custo, baixa toxicidade e de fácil obtenção para desempenhar essa função.

[014] Um dos principais desafios na área é a ampliação de invenções que além de fácil obtenção, apresentem baixo custo, baixa toxicidade, alta biocompatibilidade e elevada sensibilidade ao rastreamento glicêmico. Dessa forma, a presente patente de invenção pode ser uma alternativa por atuar de forma promissora para solucionar essa problemática.

Breve descrição dos desenhos

[015] Na Figura 1 encontra-se a imagem de distribuição e tamanho do sistema CQD derivado de BSA, obtida através da técnica de Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET), que possibilita a confirmação da formação desse nanomaterial e a identificação de características morfológicas das nanopartículas (A). O espectro de infravermelho dos CQD derivados de BSA (B), em concordância com a literatura, encontram-se bandas espectrais em torno (3448 cm^{-1}) referentes a hidroxila, vibração C=O em (1672 cm^{-1}) e estiramento simétrico derivado do grupo carboxilato em (1406 cm^{-1}). O espectro Ultravioleta-visível dos CQD 8h derivado da BSA (C), e a partir dele é possível confirmar de fato que essas nanopartículas absorvem fortemente no UV e que a absorção decai à medida que o comprimento de onda aumenta. Espectros de emissão de fluorescência dos CQD em diferentes comprimentos de onda de excitação (D). Usando a técnica de Espectroscopia de Fluorescência, esses perfis de emissão foram obtidos com o intuito de verificar propriedades ópticas das nanopartículas em estudo.

[016] Na Figura 2 tem-se os espectros de supressão de fluorescência dos CQD ($\lambda_{exc} = 350\text{nm}$) na presença de Albumina soro bovino (BSA) (A) , Albumina glicada soro bovino (gBSA) (B) , Albumina soro humano (HSA) (C) , Albumina

glicada soro humano (gHSA) (D) e d-glicose (E), respectivamente. O espectro de fluorescência dos CQD apresentou uma redução da intensidade de fluorescência devido à adição das proteínas glicadas, não-glicadas e a d-glic.

[017] A figura 3 demonstra a afinidade dos CQD com a Albumina glicada soro humano (gHSA).

[018] Na Figura 4 tem-se os gráficos de Stern-Volmer, para a supressão de fluorescência dos Carbon dots(CQD) pela titulação de BSA, gBSA, HSA, gHSA e d'glic.

[019] A Figura 5 revela o efeito de típicos interferentes presentes em amostras biológicas, mostrando o nível baixo de interferência destes componentes frente à albumina glicada.

[020] Na figura 6 tem-se a representação gráfica da obtenção de carbon dots através da classe bottom-up na qual o método de carbonização hidrotérmica (HTC) está inserido.

Descrição da invenção

[021] Obtenção das nanopartículas de carbono.

[022] A referida invenção é baseada em estudos interacionais entre os principais componentes utilizados, a nanopartícula de carbono do tipo Quantum dots e a albumina glicada como biomarcador do controle glicêmico. Como princípio de execução da invenção é preferível a síntese dos carbon dots por carbonização hidrotérmica, uma técnica ambientalmente adequada e de baixo custo por utilizar temperaturas moderadas (abaixo de 300 °C). Esta técnica faz parte da classe de obtenção de carbon dots denominada Bottom-up, onde a formação do nanomaterial ocorre a partir de precursores moleculares e reações químicas. Nessa classe, resíduos de aminoácidos presentes nas proteínas utilizadas como precursores moleculares funcionalizam a superfície dos carbon dots, conferindo características essenciais ao nanomaterial formado, que é amplamente utilizado na identificação e rastreamento de alguns compostos através do fenômeno de supressão de fluorescência.

[023] Carbon dots foram obtidos por Carbonização Hidrotérmica, uma técnica que tem recebido ampla atenção por se tratar de um processo simples e ambientalmente adequado, além de utilizar temperaturas moderadas (abaixo de 300 °C) para obtenção do produto final. Posteriormente para caracterização do nanomaterial obtido, o mesmo foi submetido as técnicas de Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET), Potencial Zeta e as técnicas espectroscópicas de Infravermelho por transformada de fourier (FTIR), Ultravioleta-visível (UV-vis) e de Fluorescência.

[024] Procedimento de síntese dos carbon dots a partir da Albumina Soro bovino (BSA)

[025] A obtenção dos CQD consiste em dissolver albumina soro bovino (BSA) em água destilada, adicionando em seguida uma pequena quantidade de etanol. Na sequência, a mistura foi sonicada até a obtenção de uma solução homogênea. As soluções obtidas foram transferidas para um reator de aço inoxidável revestido de teflon e aquecido em uma mufla a 180 °C por 4, 8 e 16h, sendo resfriadas logo em seguida a temperatura ambiente. Após a realização inicial da síntese, as soluções foram separadas e centrifugadas.

[026] Os sobrenadantes foram colocados em aparelhos de ultrafiltração Amicon Ultra (Milipore) com capacidade volumétrica de 500 µL. Os filtros foram colocados dentro de tubos coletores e centrifugados por alguns minutos. Finalmente, o produto formado foi exposto a luz UV para observar a luminescência.

[027] Tratamento amostral frente às técnicas de caracterização

[028] O preparo da amostra consistiu em adicionar 5 gotas da solução aquosa de CQD, na concentração de 0,01 mg/mL, sobre uma grade de cobre revestida com filme de Carbone/Formvar(400 mesh). Em seguida, deixou-se o solvente evaporar a temperatura ambiente. Os carbon dots obtidos apresentaram boa distribuição em uma faixa de 50 nm, morfologia quase esférica, apresentando algumas irregularidades e com tamanho aproximado de 5 nm, em concordância com a literatura (FRIGERIO et al., 2012).

[029] O preparo da amostra para caracterização a partir da técnica de espectroscopia de infravermelho, consistiu em transferir para o suporte uma alíquota de CQD que foram inicialmente secos. Os espectros foram obtidos em um espectrofotômetro Perkin Elmer, Spectrum 400 no modo de transmitância, na faixa de 4000 a 550 cm^{-1} com resolução de 4 cm^{-1} e 16 acumulações (scans) por espectro.

[030] A análise de Potencial Zeta foi realizada usando o equipamento Zetasizer Nano ZS90. E o preparo da amostra utilizou uma dispersão aquosa de CQD, na concentração de 0,01 mg/mL.

[031] O valor obtido para o CQD a partir da medida de Potencial Zeta, que fornece informação da carga superficial das partículas e de sua estabilidade coloidal. O valor medido foi de -11,4 mV, relativamente alto, indicando uma estabilidade intermediária da suspensão coloidal, no qual a carga negativa corrobora com o resultado de infravermelho, o qual indicou a presença de grupos carboxilatos na superfície do carbon dots. Os espectros de absorção dos carbon dots foram obtidos utilizando um espectrofotômetro Erkin Elmer-Lambda 650. O aparelho foi configurado para monitorar os CQD (0,01 mg/mL) entre os comprimentos de onda de 200 nm e 500 nm.

[032] Na literatura é descrito que os CQDs apresentam níveis elevados de absorção óptica na região do ultravioleta, com valores que se estendem para a região do visível (BERA, D. et al,2008). Também é descrito que as transições eletrônicas podem ser do tipo $\pi - \pi^*$ de ligações C=C de anéis aromáticos e $\pi - \pi^*$ correspondente a ligação C=O.

[033] O espectro de absorção apresentou banda centrada em aproximadamente 270 nm que pode estar associada as transições eletrônicas $\pi - \pi^*$ de ligações C=C de anéis aromáticos como abordado na literatura.

[034] A partir da espectroscopia de fluorescência é possível realizar medições de supressão de fluorescência, uma técnica que pode ser definida como qualquer processo que ocasiona uma redução na intensidade de fluorescência. Essa diminuição de intensidade pode ser expressa pela Equação de Stern

Volmer:

$$\frac{F_0}{F} = 1 + k_q \cdot \tau_0 [Q] = 1 + K_{SV}$$

Onde F_0 e F são as intensidades de fluorescência na ausência e na presença do supressor, respectivamente e $[Q]$ é a concentração do supressor, neste caso, proteínas não glicadas BSA e HSA, proteínas glicadas gBSA e gHSA, assim como também a d-glicose.

[035] Os espectros de emissão de fluorescência foram medidos em um espectrofluorímetro Jasco FP-6300, utilizando uma cubeta de quartzo de quatro faces lisas com 0,1 mm de caminho óptico, a temperatura constante de 25°C. O aparelho foi configurado para excitar os CQD (0,04 mg/mL) de 280 nm a 400 nm, e a emissão foi monitorada entre os comprimentos de onda de 350 nm e 550 nm, com as fendas de excitação e emissão mantidas em 5 nm. Outra parte dos espectros de emissão de fluorescência foram medidos em um espectrofluorímetro FluoroHub-3 Horiba Jobin Yvon 135, a temperatura constante de 25°C. O aparelho foi configurado para excitar os CQD em 350 nm por ser o comprimento de onda correspondente ao máximo de emissão. A emissão foi monitorada entre os comprimentos de onda de 370 nm e 550 nm, com as fendas de excitação de emissão mantidas em 2 e 1, respectivamente.

[036] Observou-se um máximo de emissão em torno de 430 nm, quando é excitado em 350 nm. Além disso, o máximo emissivo do carbon dot é dependente do comprimento de onda de excitação e uma redução de intensidade ocorreu à medida que o comprimento de onda de excitação variava para maiores comprimentos de onda.

[037] Verificou-se que os CQD obtidos pelo tempo de 8h apresentaram um nível de intensidade emissiva mais elevado em comparação com os outros, e o perfil de emissão foi o mesmo para todas as sínteses. Dessa forma, CQD 8h foi selecionado para ser utilizado no decorrer do estudo por apresentar emissão mais intensa.

[038] Visando analisar as possíveis interações existentes entre as proteínas e a d-glicose com os CQD, foi aplicado o método que mede a quantidade de supressão de fluorescência. Inicialmente, foi realizado para BSA e gBSA devido

a sua similaridade estrutural com a albumina humana (HSA). A partir desse protótipo foram verificadas as interações com a HSA, gHSA e d-glicose. O comprimento de onda de excitação usado foi de 350 nm por ser o comprimento referente ao máximo emissivo dos CQD. Para os estudos de interação de proteínas foram inicialmente tituladas em doze concentrações (0 à 207,6 μM) em uma solução de CQD (0,6 mg/mL) em tampão fosfato 0,1M (pH 7,4). O mesmo procedimento foi realizado para as proteínas glicadas, entretanto foram usadas as concentrações (0 à 10,0 μM) e para a d-glicose as concentrações (0 à 10 μM).

[039] Na sequência, foram obtidas a partir de regressões lineares as constantes de Stern Volmer (K_{sv}) para cada sistema. Na figura 4 tem-se o gráfico logxlog, onde a partir dele obteve-se as constantes de ligação (K_a) e o número de sítios de ligação (n), que são parâmetros importantes no estudo de interação dos sistemas.

Utilizando os valores de coeficiente angular e linear, os sistemas foram calculados usando a equação:

$$\log \log \left(\frac{F_0 - F}{F} \right) = \log \log [ka] + n \log \log [Q]$$

[040] Para o estudo de potenciais interferentes, foram obtidos espectros de emissão dos CQD (0,6 mg/mL) dissolvidos numa solução tampão de pH=7,4, e depois espectros de emissão dos CQD com a adição de gHSA na concentração de 6,25 μM .

[041] Posteriormente, repetiu-se o procedimento anterior, onde foram usadas soluções separadamente de Tf, Trp, Ácido ascórbico, Arg, Fen, Ser, Met e Val. Por questões de escalonamento do método, as concentrações utilizadas correspondem a 40 diluições do que é encontrado no soro.

[042] Visando avaliar potenciais interferentes, foi realizado inicialmente a análise da supressão dos carbon dots frente à gHSA e em seguida para algumas substâncias potencialmente interferentes que coexistem no soro. A Figura 5 aponta uma boa sinalização para gHSA quando comparada as outras substâncias,

comprovando que os CQD apresentaram uma maior afinidade para a proteína glicada. Dessa forma, os processos mencionados atestam a eficácia e aplicabilidade da utilização de carbon dots como agente supressor de proteínas glicadas, para o controle glicêmico.

Exemplos de concretizações da invenção

[043] Podem ser citados 2 estudos essenciais que antecedem, norteiam e atestam a forma preferível de execução da presente invenção. O primeiro, consiste na análise de potenciais interferentes, visando avaliar a existência de interferências advindas da presença de processos hemolíticos e da concentração de outros compostos no sangue, tendo em vista que esses processos afetam os resultados do exame tradicional de hemoglobina glicada (HbA1c). É possível verificar que mesmo na presença de diversos potenciais interferentes, a afinidade existente entre a proteína glicada (gBSA) e o agente detector (CQD) sofre baixíssima interferência nesse processo, como representado pela figura 5. O segundo estudo destaca-se pela verificação de afinidade existente entre os componentes da presente invenção, com os CQD a partir das constantes de ligação como demonstrado na tabela 1.

Amostras	Ksv (10^4 M^{-1})	n	Ka (10^4 M^{-1})
BSA	$0,214 \pm 0,005$	1,0	0,2280
gBSA	$8,482 \pm 0,162$	$1,149 \pm 0,016$	$48,9788 \pm 0,0001$
HSA	$0,182 \pm 0,002$	$0,973 \pm 0,027$	$0,1419 \pm 0,0001$
gHSA	$1,311 \pm 0,021$	$1,132 \pm 0,041$	$6,339 \pm 0,0002$
d-glic	$0,183 \pm 0,003$	$0,841 \pm 0,063$	$0,038 \pm 0,0002$

Tabela 1. Valores de Ksv, de constante de ligação(Ka) e número de sítios de ligação(n) para cada sistema.

[044] Esses valores demonstram que os CQD ligam-se com as proteínas glicadas, não glicadas e a d-glicose. A proporção formada é de aproximadamente 1:1, sugerindo que apenas 1 molécula interage com os CQD. Ao verificar os valores de constantes de ligação observa-se que os CQD ligam-se mais fortemente as proteínas glicadas do que as proteínas não glicadas e a d-glicose. Portanto, a alta afinidade existente entre os CQD e a albumina glicada mostra o potencial promissor para o controle de diabetes, a partir

destes parâmetros iniciais que atestam essa eficácia, tem-se a forma preferível de execução da presente invenção.

[045] Nessa seção é apresentado um exemplo preferível de manipulação e aplicação da amostra contendo as nanopartículas fluorescentes, capazes de atuar como biosensores de proteínas glicadas, como descrito na presente invenção.

[046] Baseando-se na literatura, o exemplo a ser apresentado segue os seguintes procedimentos operacionais padrão (POP) de coleta e manipulação de amostras sanguíneas: Publicado em 1995 por FLEMING, D.O. et al o protocolo “Laboratory BSafety: Principles and Practices” p. 406, com esquematizações sobre o processamento de amostras sanguíneas. E em 1996 publicado por Gomes, Antônio P. F. et al o “manual de coletas de amostras biológicas e biossegurança”, 1ª edição, p. 20-22.

[047] O protocolo consiste na manipulação da amostra sanguínea após a retração total do coágulo e centrifugação por cerca de 15 minutos a 1.500 rpm. Após a realização do procedimento inicial, o soro é separado utilizando micropipeta e acondicionado em um tubo de ensaio ou tubo para sorologia. Com as amostras em temperatura ambiente (24°C) é realizada a transferência de 2 mL do soro para um béquer de capacidade volumétrica de 25 mL. Na sequência, é gotejado 1 mL da solução de c.dots 8h derivado da BSA, que apresentou maior intensidade de emissão e mesmo perfil emissivo em todas as sínteses. Essa composição é transferida para uma cubeta de quartzo de 4 faces lisas e com caminho 0,1mm de caminho óptico, podendo ser analisada em um espectrofluorímetro ou espectrofotômetro de fluorescência, programado para monitorar a solução em 350 nm por ser o comprimento correspondente ao máximo de emissão dos CQDs e em comprimentos de excitação de CQDs entre 300 e 500 nm.

[048] A determinação experimental da concentração de albumina glicada presente na amostra, será possível a partir da construção de uma curva de calibração, utilizando concentrações conhecidas de CQDs e medidas de

absorbâncias obtidas nos diferentes comprimentos de onda de excitação. O objetivo é obter linearidade nas concentrações em função dos valores de absorbância, obtidos pelo espectrofotômetro.

[049] Sendo assim, é de grande relevância a esquematização e desenvolvimento de um procedimento mais sensível e preciso ao rastreamento de proteínas glicadas, utilizando nanomateriais de fácil obtenção, de baixa toxicidade e custo, demonstrando um avanço tecnológico em potencial para os mecanismos tradicionais de controle glicêmico.

REIVINDICAÇÕES

- 1) Nanopartículas de carbono, **caracterizadas por** tamanhos pequenos ($\leq 5\text{nm}$), morfologia quase esférica, quimicamente inerte, fácil funcionalização e com luminescência multicolorida.
- 2) Nanopartículas de carbono, **caracterizadas por** alta fotoestabilidade, resistência à fotodegradação e alta solubilidade em meios aquosos e solventes orgânicos.
- 3) Nanopartículas de carbono, **caracterizadas por** serem obtidas de forma simples, a partir de materiais de baixo custo, alta biocompatibilidade e, possuindo, também, baixa toxicidade.
- 4) Nanopartículas de carbono, como sondas nanométricas, **caracterizadas por** serem capazes, preferencialmente, de se ligar à albumina glicada (índice glicêmico de médio prazo) e detectar o complexo nanopartícula-albumina glicada, através das propriedades luminescentes das nanopartículas.
- 5) Nanopartículas de carbono, **caracterizadas pela** aplicação em diversos bio-fluidos complexos, como sangue e urina, sofrendo baixa interferência de componentes moleculares presentes neste tipo de amostra.
- 6) Nanopartículas de carbono, **caracterizadas pela** aplicação em meios biológicos (*in vivo*), para imageamento e dosagens glicêmicas em órgãos específicos, visando diagnósticos e tratamentos mais precisos em doenças, como diabetes.

DESENHOS

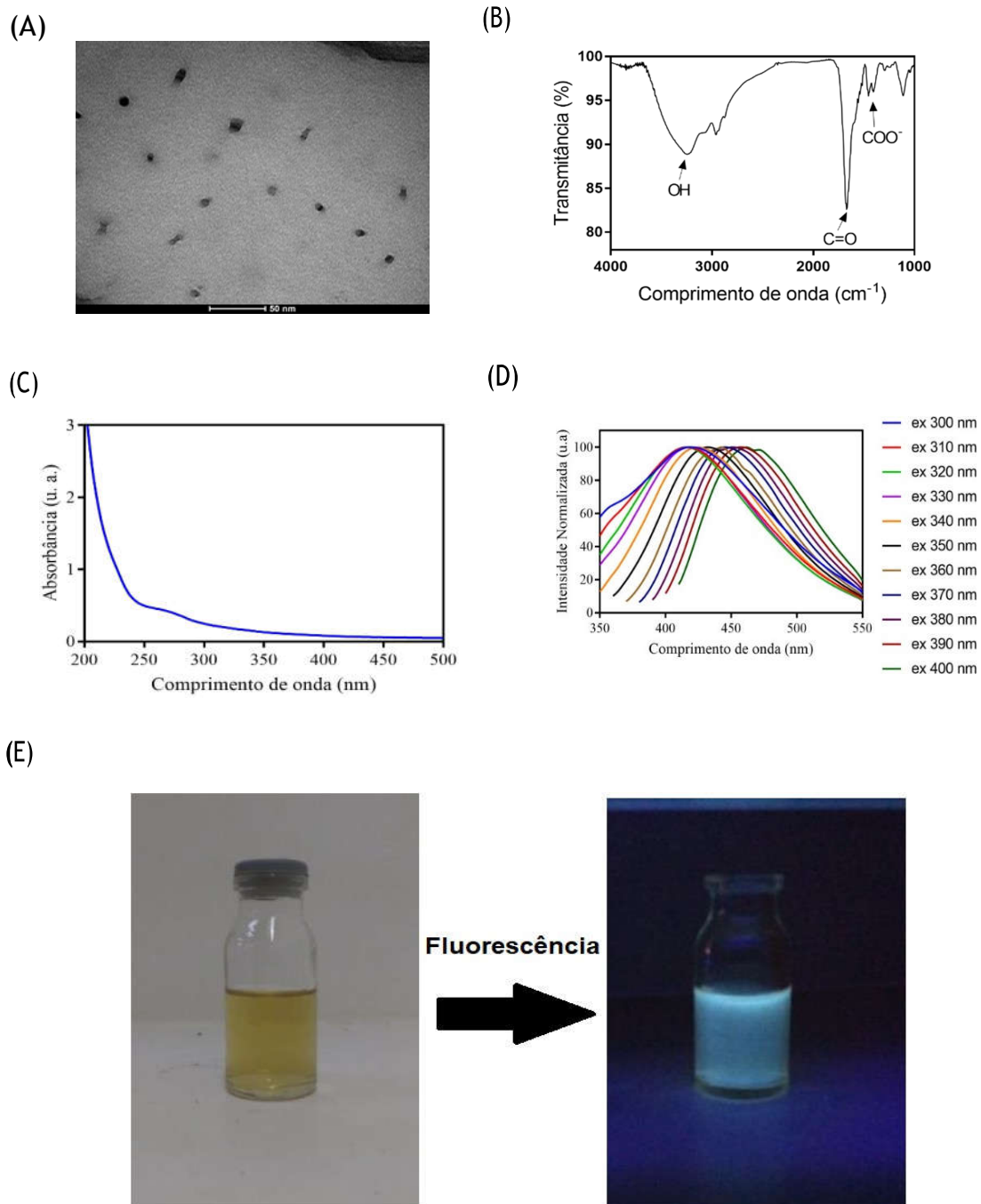
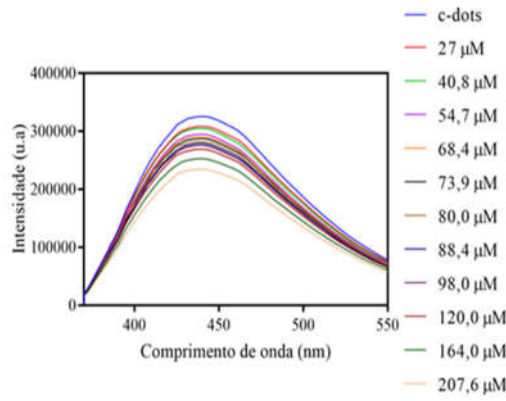
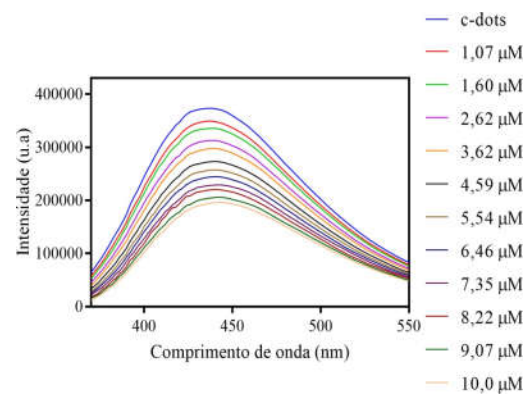


Figura 1

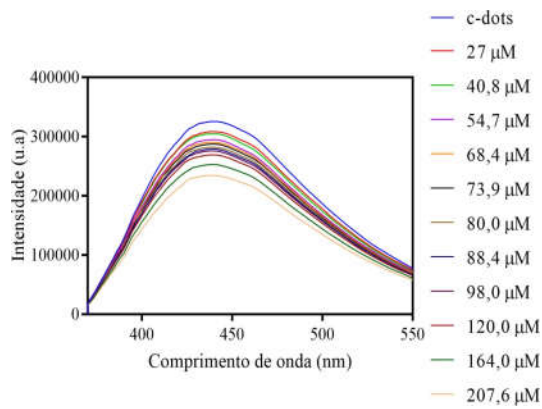
(A)



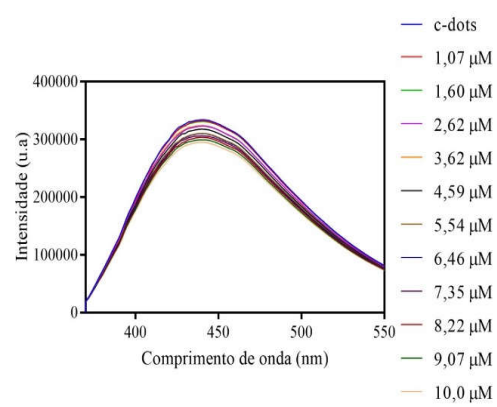
(B)



(C)



(D)



(E)

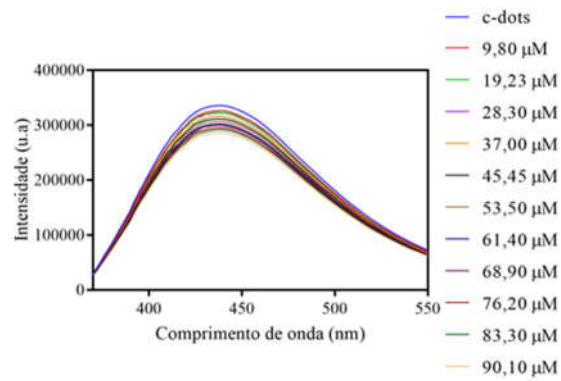


Figura 2

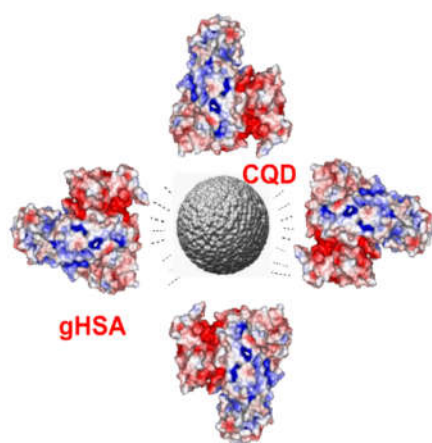


Figura 3

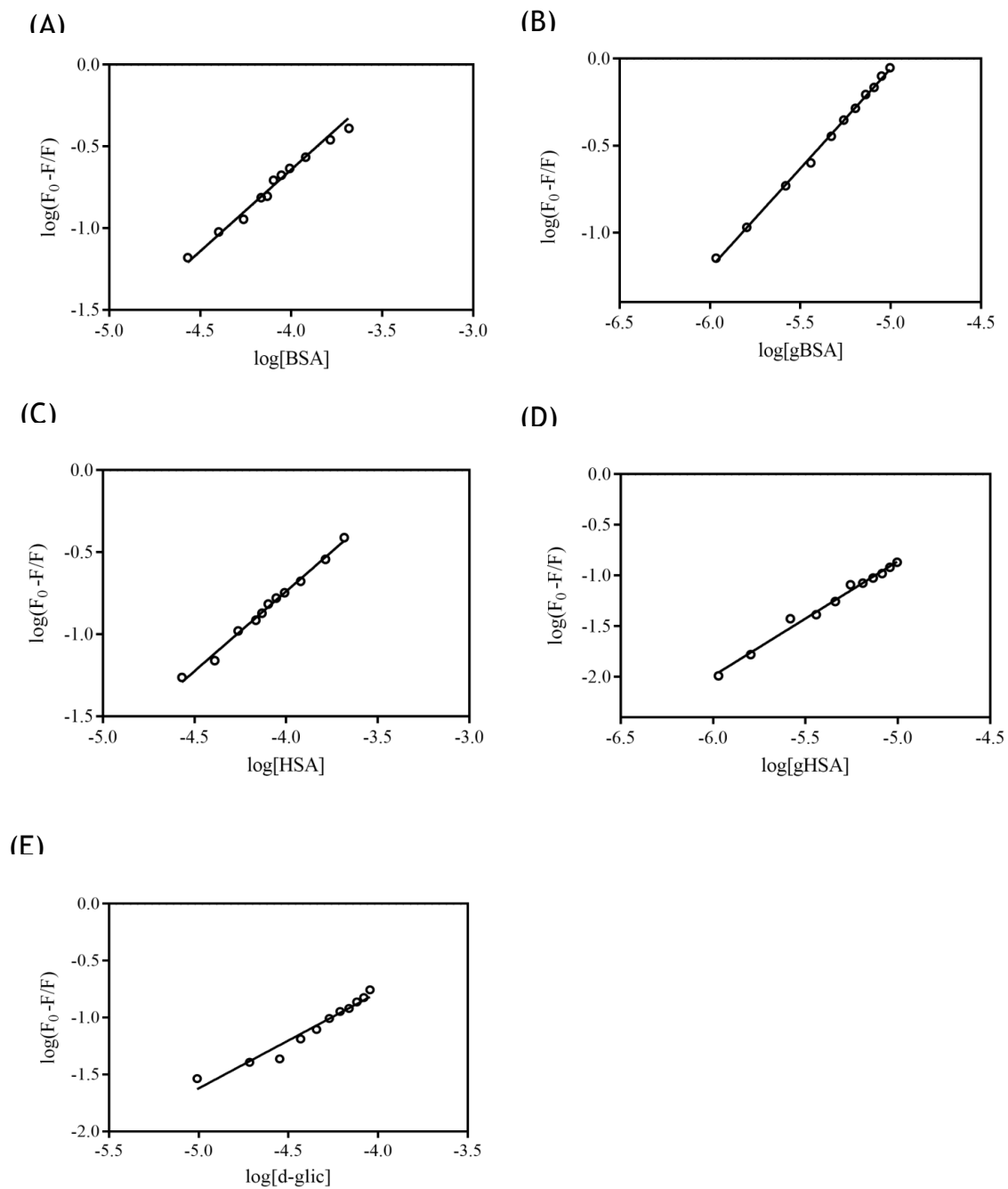


Figura 4

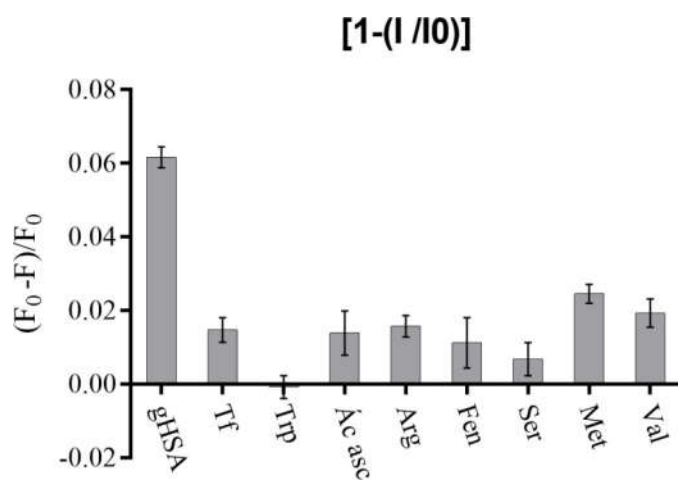


Figura 5

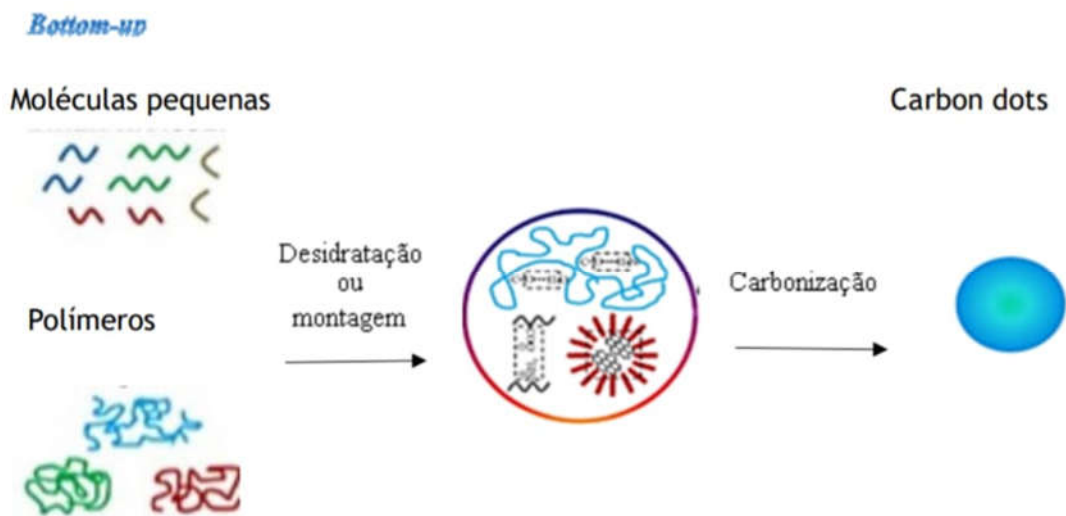


Figura 6

RESUMO**Nanoprobos carbonáceos de baixo custo e toxicidade para o controle glicêmico via detecção seletiva *in vitro/in vivo* da albumina glicada**

A presente invenção baseia-se no desenvolvimento e aplicação de nanopartículas carbonáceas para detecção de proteínas glicadas, visando o controle de diabetes. O êxito na obtenção desses sistemas foi confirmado por diversas técnicas físico-químicas. As nanopartículas são bem distribuídas em tamanho ($\approx 5\text{nm}$) e formato esférico. Estas nanopartículas são quimicamente inertes, com baixo custo, fácil funcionalização, alta biocompatibilidade, baixa toxicidade e com luminescência multicolorida. Além disso, exibem alta foto-estabilidade, resistência à fotodegradação e alta solubilidade em meios aquosos e solventes orgânicos, superior a outras nanopartículas fluorescentes. Estas nanopartículas servem como excelentes sondas nanométricas, capazes, preferencialmente, de se ligar à albumina glicada (índice glicêmico de médio prazo) e detectar o complexo nanopartícula-albumina glicada, através das propriedades luminescentes das nanopartículas. Além disso, podem ser usadas em diversas amostras complexas, como sangue e urina, sofrendo de baixa interferência de componentes moleculares presentes neste tipo de amostra. Finalmente, podem ser aplicadas em meios biológicos (*in vivo*), para imageamento e dosagens glicêmicas em órgãos específicos, visando diagnósticos e tratamentos mais precisos em doenças, como diabetes.